

مطالعه آپوپتوز در بافت اپیدیدیم پس از کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش صحرایی بالغ

میرهادی خیاط نوری^۱، سید اسماعیل صفوی^۲

^۱ استادیار، گروه فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

^۲ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

چکیده

سابقه و هدف: در گونه‌های مختلف پستانداران، درجه حرارت بیضه پایین‌تر از حرارت محوطه بطنی می‌باشد و نشان داده‌اند که این دمای پایین برای روند اسپرمatoژن و باروری اسپرم ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی آپوپتوز پس از کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش صحرایی بالغ در بافت اپیدیدیم می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰ گرم) به ۱۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. با ثابت کردن بیضه‌های راست به دیواره شکم، در هفت گروه کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه ایجاد گردید. در گروه‌های اول تا هفتم بترتیب ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از عمل، حیوانات کالبد گشایی شده و اپیدیدیم آنها در سه قسمت سر، بدن و دم مورد مطالعه قرار گرفت. در گروه هشتم تا چهاردهم به عنوان گروه شم پس از برش، بیضه‌ها از کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی جابجا شده و سپس به کیسه بیضه بازگردانده شدند. در گروه پانزدهم به عنوان گروه شاهد هیچ گونه عملی صورت نگرفت. پس از نمونه برداری از بافت اپیدیدیم و ثبوت در فرمالین ۱۰ درصد نمکی، پاساز بافتی و تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی با روش تانل، اپیدیدیم از نظر آپوپتوز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: رنگ‌آمیزی تانل مشخص ساخت که کریپتورکیدیسم تجربی موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های پوششی اپیدیدیم می‌شود. اوج سلول‌های آپوپتویک در روزهای سوم و ششم پس از عمل مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شم و شاهد وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که کریپتورکیدیسم تجربی موجب القاء آپوپتوز می‌شود و این اثر احتملاً به دلیل استرس حرارتی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های بافت پوششی اپیدیدیم است.

واژگان کلیدی: کریپتورکیدیسم، آپوپتوز، اپیدیدیم، موش صحرایی بالغ

مقدمه

فقدان اسپرم (آزواسپرمی)، فاکتور ایجاد کننده کریپتورکیدیسم است (۱). در گونه‌های مختلف پستانداران درجه حرارت نسبتاً پایین برای روند طبیعی اسپرمatoژن و باروری اسپرم مورد نیاز است. مطالعات مشخص کرده که درجه حرارت کیسه بیضه در اغلب پستانداران ۴ تا ۵ درجه سانتی گراد از حرارت داخل محوطه بطنی پایین‌تر است. اختلال در روند اسپرمatoژن متعاقب کریپتورکیدیسم، به دنبال قرار گرفتن بیضه‌ها در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی ایجاد می‌شود. گزارش کرده‌اند که با سرد کردن بیضه‌ها در

کریپتورکیدیسم یا نهان‌بیضگی به دنبال نقص در پایین آمدن بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه در زمان تولد حاصل می‌شود و یکی از علل ناباروری در انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانی می‌باشد. در ۳ تا ۸ درصد مردان نابارور و ۲۰ درصد مردان با

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی، میرهادی خیاط نوری

(email: khayat_nouri@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۳۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۹/۲۰

در اپی دیدیم در روز سوم و پنجم پس از عمل گزارش شد (۳). برخی محققین نیز پس از ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی یک طرفه کاهش معنی داری را در درصد غلظت و میزان تحرک اسپرم ها در اپی دیدیم در هفتاده دهم پس از عمل گزارش نمودند (۱۱). مطالعه مشابه دیگری در سگ های کریپتور کید، آزو اسپرمی (عدم وجود اسپرم)، کاهش درصد تحرک، کاهش میزان کل اسپرم و کاهش میزان اسپرم های نرمال را نشان داد (۱۲). متعاقب کریپتور کیدیسم عمل ذخیره اسپرم در اپی دیدیم و همچنین توانایی حفظ حیات اسپرم ها در درجه حرارت داخل شکمی شدیداً دچار اختلال می گردد و افزایش دمای اپی دیدیم با تغییراتی در ساختار پروتئینی مایع ترشحی از اپی دیدیم، و همچنین تغییر ترشح آب و یون ها از اپی تلیوم اپی دیدیم همراه است (۳). میزان طبیعی تستوسترون داخل بیضوی و داخل اپی دیدیم که توسط سلول های لیدیگ ترشح می شود و میزان طبیعی پروتئین متصل به آندروژن (ABP)، که توسط سلول های سرتولی ترشح می شود، برای فعال شدن و تداوم اسپرماتوژن و مراحل بلوغ اسپرم در داخل اپی دیدیم ضروری است. کاهش میزان تستوسترون داخل بیضه، افزایش درجه حرارت و استرس اکسیداتیو بدنبال کریپتور کیدیسم، حیات سلوی، بلوغ اسپرماتیدها و عملکرد طبیعی سلول های اپی دیدیم را تحت تأثیر قرار می دهد (۳). با توجه به این که تمامی مطالعات انجام گرفته قبلی بیشتر در زمینه تغییرات بافتی بر پایه رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین است و اطلاعات محدودی در مورد پدیده آپوپتوz متعاقب کریپتور کیدیسم تجربی وجود دارد، تحقیق در این مورد امری ضروری به نظر می رسد.

مواد و روشها

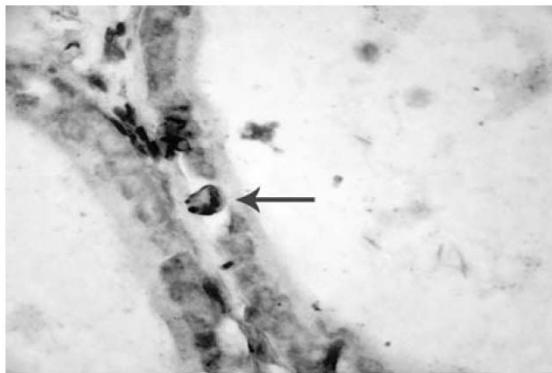
در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نر بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) نژاد ویستار، از موسسه واکسن و سرم سازی رازی خریداری شده و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشناختی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. غذا و آب به صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار گرفت. موش های صحرایی به صورت تصادفی به ۱۵ گروه هشت تایی تقسیم شدند، به طوری که ۷ گروه تحت عمل جراحی کریپتور کیدیسم یک طرفه، ۷ گروه به عنوان گروه شم و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد.

برای ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی ابتدا داروی رامپون (Alfasan)، هلند) با دوز ۲ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن

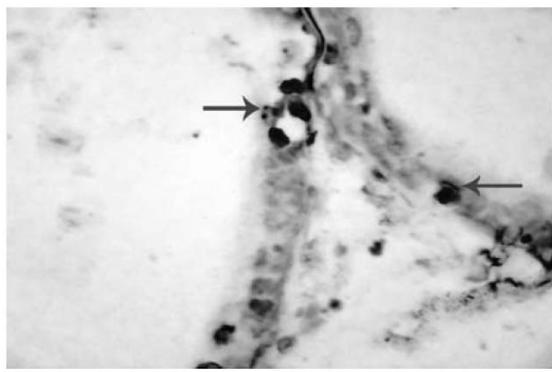
داخل محوطه بطنی حیوانات، اسپرماتوژن طبیعی حاصل می شود (۲). مطالعات فراوانی در مورد اثرات کریپتور کیدیسم تجربی بر روی بافت بیضه و اپی دیدیم در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است (۲-۴). مطالعات هیستولوژیک در بیضه و اپی دیدیم به دنبال ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی هم در موش های صحرایی بالغ (۵) و هم در موش های صحرایی نابالغ (۶) صورت گرفته است. در تمامی مطالعات انجام شده ارتباط نسبی بین وسعت فعالیت ضد اسپرمی و طول دوره کریپتور کیدیسم بیان شده است، ولی در مورد تغییرات بافت اپی دیدیم اطلاعات چندانی در دست نمی باشد. بنابراین برای بیان بهتر اثرات کریپتور کیدیسم روی بافت اپی دیدیم و درک بهتر پاتوفیزیولوژی صدمات وارد، مهم ترین راه بررسی تأثیر کریپتور کیدیسم روی بافت اپی دیدیم می باشد. اپی دیدیم وظیفه تقلیل، بلوغ، انتقال و ذخیره اسپرم را بر عهده دارد. اپی دیدیم به سه قسمت سر، بدن و دم تقسیم می شود. نقش بخش ابتدایی اپی دیدیم در بلوغ اسپرم می باشد، در حالی که قسمت انتهایی نقش ذخیره اسپرم را بر عهده دارد. نشان داده اند که آندروژن ها بیان ژن های اختصاصی را در اپی تلیوم اپی دیدیم تنظیم می کنند و باعث تغییراتی در الگوی ترشح پروتئین در بسیاری از قسمت های اپی دیدیم می شوند. همچنین مشخص شده است که رشد و نمو اپی دیدیم و غدد ضمیمه جنسی تحت کنترل آندروژنهاست (۷). محققین دریافت ها اند که افزایش درجه حرارت بیضه باعث کاهش میزان تستوسترون سرم خون شده و این افزایش دما در بافت اپی دیدیم موجب تغییراتی در ساختار پروتئین سلول های پوششی اپی دیدیم می شود (۸). در یک بررسی، پس از ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی یک طرفه در موش های صحرایی نابالغ تغییرات معنی داری در وزن، قطر لوله ها و ضخامت اپی دیدیم پس از عمل کریپتور کیدیسم مشاهده شد (۹). درجه حرارت از فاکتور های بسیار مهم در عملکرد فیزیولوژیک اپی دیدیم می باشد. مشخص شده است که درجه حرارت، ذخیره اسپرم را در ناحیه دم اپی دیدیم در موش صحرایی و خرگوش تنظیم می کند. عمل ذخیره اسپرم در دم اپی دیدیم و توانایی آن در حفظ بقاء اسپرم شدیداً وابسته به درجه حرارت اسکروتوم بوده و با افزایش دما دچار اختلال می شود (۷). مشخص شده است که با ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی از طریق بستن کانال اینگوئینال و کریپتور کیدیسم مادرزادی، الگوی رشد طبیعی مجاری آوران و اپی دیدیم دچار تغییر می شود (۱۰، ۸). در تحقیقی پس از ایجاد کریپتور کیدیسم تجربی دو طرفه در موش های صحرایی بالغ، کاهش درصد تحرک و میزان اسپرم ها

یافته‌ها

مطالعه مقاطع بافتی گروه‌های مختلف نشان داد که آپوپتوز در سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم مشاهده می‌شود (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱-۱ مقطع بافت لوله اپی‌دیدیم در ناحیه بدن در روز سوم پس از عمل. سلول آپوپتوتیک به رنگ تیره در اپی‌تیلیوم لوله‌ها دیده می‌شود (↑). رنگ آمیزی تانل. درشت نمایی $\times 400$.



شکل ۲-۲ مقطع بافت لوله اپی‌دیدیم در ناحیه بدن در روز ششم پس از عمل. تعدادی سلول آپوپتوتیک به رنگ تیره در اپی‌تیلیوم لوله‌ها دیده می‌شود (↑). تعداد سلولهای آپوپتوتیک در مقایسه با روز سوم بیشتر است. رنگ آمیزی تانل. درشت نمایی $\times 400$.

آنالیز آماری سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که بین گروه شاهد و گروه شم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، بنابراین ارقام مربوط به گروه شاهد ذکر نشده است. میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک یک روز پس از عمل کریپتورکیدیسم، در قسمت سر اپی‌دیدیم راست (داخل شکمی) برابر با $26/۳۴ \pm ۳/۶۳ \times 10^{-۲}$ بود که در مقایسه با گروه شم یک روزه ($24/۱۸ \pm ۳/۱۸ \times 10^{-۲}$) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی در روزهای سوم، ششم و دهم پس از عمل، به ترتیب $180/۵۹ \pm ۹/۷۵ \times 10^{-۲}$ ، $150/۲۹ \pm ۷/۲۵ \times 10^{-۲}$ و $150/۲۹ \pm ۵/۴۸ \times 10^{-۲}$ بود که در

بدن به عنوان داروی پیش‌بیهوشی و پس از ده دقیقه داروی کیتامین (Alfasan، هلند) با دوز ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد تا بیهوشی کامل و عمیق حاصل گردد. سپس با ایجاد یک برش طولی روی خط میانی شکم، پوست و عضلات دیواره بطنی و صفاق برش داده شد. بیضه راست از ناحیه کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی کشیده شده و با استفاده از نخ بخیه شماره چهار صفر نایلونی (SUPA، ایران)، از ناحیه دمی به دیواره عضلانی محوطه بطنی بخیه زده شد. برای جلوگیری از بازگشت بیضه به کیسه بیضه، گوبربناکولوم قطع گردید. روی بیضه چپ هیچ گونه عملی صورت نگرفت. در ادامه عضلات دیواره بطنی با استفاده از نخ بخیه کات‌گوت سه‌صرف (SUPA، ایران)، به صورت سرتاسری و پوست با استفاده از نخ بخیه سیلک شماره سه صفر (SUPA، ایران) به صورت تشکی افقی بخیه زده شد. در گروه شم پس از بیهوشی و ایجاد برش، بیضه‌ها داخل محوطه بطنی کشیده و دوباره به داخل کیسه بیضه بازگردانده شده و عضلات و پوست به روش قبلی بخیه زده شد. در گروه شاهد هیچ گونه عملی روی حیوان صورت نگرفت.

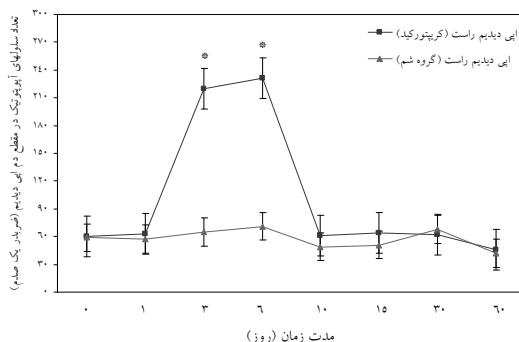
حیوانات گروه‌های اول تا هفتم بترتیب $۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰$ و ۶۰ روز پس از عمل کریپتورکیدیسم، کالبدگشایی شده و نمونه اپی‌دیدیم برای تهیه مقاطع هیستولوژیک به محلول فرمالین نمکی ۱۰ درصد (Merck، آلمان) منتقل گردید. پس از فیکس شدن مراحل مختلف پاساز بافت بر روی نمونه‌ها انجام شده و پس از قالب‌گیری با پارافین از آنها مقاطع سریال با ضخامت 3 میکرومتر تهیه گردید. مقاطع مذکور به روش تانل با استفاده از کیت استاندارد شرکت Roche و طبق روش کارخانه سازنده کیت، رنگ آمیزی گردید. همچنین برای رنگ آمیزی زمینه بافت، از روش تولوئیدین بلو (Merck، آلمان) استفاده شد. در ادامه سلول‌های آپوپتوتیک که به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شدند، در قسمت‌های مختلف بافت اپی‌دیدیم (سر، بدن و دم) مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان مقاطع عرضی لوله‌های اپی‌دیدیم، 20 لوله به صورت تصادفی انتخاب شده و میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در آنها ثبت گردید.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی جهت تحلیل داده‌ها استفاده گردید. $p < 0.05$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

آپوپتوز در بافت اپی‌دیدیم پس از کریپتوکیدیسم تجربی یک طرفه

مقایسه با گروه شم مشابه ($17 \times 10^6 / 34 \pm 6$) مقایسه با گروه شم مشابه ($10 \times 10^6 / 59$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید، ولی در روزهای سوم و ششم پس از عمل، میانگین سلول‌های آپوپتوتیک به ترتیب $12 \times 10^6 / 85 \pm 12$ و $23 \times 10^6 / 115 \pm 15$ بود که در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). نتایج مقایسه تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در روزهای مختلف، در قسمت‌های مختلف اپی‌دیدیم (سر، بدن و دم) نشان داد که فقط در قسمت سر و بدن اپی‌دیدیم، تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بین روز دهم در مقایسه با روزهای سوم و ششم بعد از عمل کریپتوکیدیسم وجود دارد (نمودار ۱ و ۲). در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از عمل کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در هر سه قسمت سر، بدن و دم اپی‌دیدیم مشاهده گردید که در مقایسه با گروه شم مشابه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱ و ۲ و ۳).

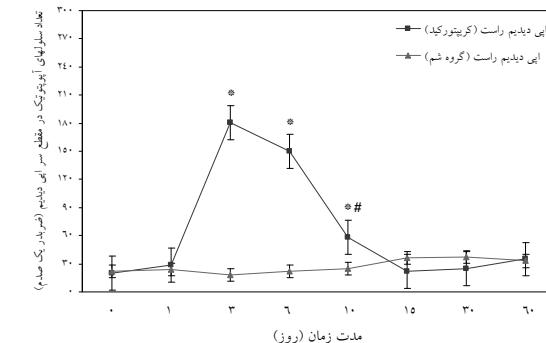
مقایسه با گروه شم مشابه افزایش معنی‌داری را نشان داد (نمودار ۱) ($p < 0.05$).



نمودار ۳ - میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در مقطع دم اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتوکیدیسم. $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شم مشابه.

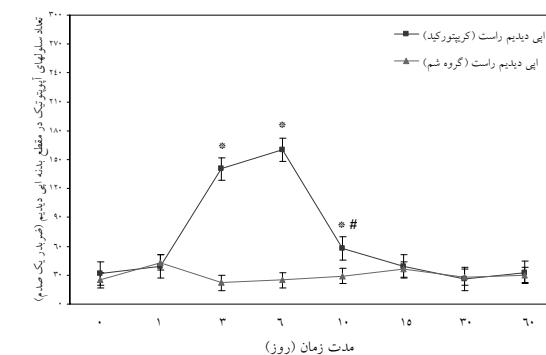
بحث

در مطالعه حاضر، پدیده آپوپتوز پس از ایجاد کریپتوکیدیسم تجربی یک‌طرفه در موش‌های صحرایی بالغ در قسمت‌های مختلف بافت اپی‌دیدیم شامل سر، بدن و دم ارزیابی شد. برای مشاهده و شمارش سلول‌های آپوپتوتیک در بافت بیضه از روش رنگ‌آمیزی تانل استفاده شد که در این روش ارزیابی کمی و کیفی آپوپتوز امکان‌پذیر است. فرآگماتاسیون اینترنوكلوزمی DNA به عنوان یکی از وقایع اختصاصی آپوپتوز مطرح است و در هیچ نوع مرگ سلولی دیگر مشاهده نمی‌شود. بنابراین روش تانل که بر پایه و اساس فرآگماتاسیون انجام می‌شود، از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها است. انتهای $3'OH$ تکه‌های شکسته شده DNA هدف این



نمودار ۱- میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در مقطع سر اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتوکیدیسم. $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شم مشابه و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه روز ۳ و ۶ هستند.

در قسمت بدن اپی‌دیدیم راست، میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در روز اول پس از عمل برابر با $39/41 \pm 4/26 \times 10^6$ بود که در مقایسه با گروه شم یک روزه ($10 \times 10^6 / 42/17 \pm 3/27$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین سلول‌های آپوپتوتیک در بدن اپی‌دیدیم راست در روزهای سوم، ششم و دهم پس از عمل به ترتیب $160/55 \pm 12/91 \times 10^6$ ، $140/27 \pm 11/65 \times 10^6$ و $58/69 \pm 4/85 \times 10^6$ بود که افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شم داشت ($p < 0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲ - میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در مقطع بدن اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتوکیدیسم. $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شم مشابه و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه روز ۳ و ۶ هستند.

میانگین سلول‌های آپوپتوتیک در ناحیه دم اپی‌دیدیم راست در روز اول پس از عمل برابر با $62/71 \pm 7/28 \times 10^6$ بود که در

نیست. از طرف دیگر نشان داده اند که کریپتوکیدیسم تجربی در موش های صحرایی بالغ منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی ها و غیرفعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدان می شود. پراکسیداسیون چربی ها و ایجاد رادیکال های آزاد اضافی، می تواند موجب آسیب پرتوئین ها، DNA و القاء آپوپتوز در سلول های بافت بیضه و اپی دیدیم گردد (۲۰). در یک بررسی انجام شده در موش صحرایی، کریپتوکیدیسم تجربی منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی های سلولی گردید که به عنوان نشانه ای از بروز استرس اکسیداتیو می باشد. رادیکال های آزاد در طی متابولیسم طبیعی سلول های بدن تولید می شوند و تولید رادیکال های آزاد بیش از ظرفیت تدافعی آنتی اکسیدان ها، موجب بروز استرس اکسیداتیو و پاسخ های غیر قابل برگشت مانند آپوپتوز یا نکروز در سلول های زنده می شود (۲۰). آنزیم گزانتین اکسیداز که به طور وسیع در بافت های بدن بخصوص در آندوتلیوم عروق کوچک دیده می شود باعث تبدیل هیپوگزاتین به گزانتین و گزانتین به اسید اوریک شده و به همراه آن سوپراکسیدها تولید می شوند. فعالیت این آنزیم در بیضه انسان و موش صحرایی تشخیص داده شده و به دلیل ایجاد آسیب های بیضوی القاء شده به خصوص به دنبال ایسکمی بافتی مورد توجه قرار گرفته است (۲۱). در یک بررسی با استفاده از مهار کننده های گزانتین اکسیداز (مثل آلوپورینول) در موش های صحرایی که تحت عمل کریپتوکیدیسم تجربی قرار گرفته بودند، محققین دریافتند که آپوپتوز سلول ها به صورت معنی داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش می باید (۲۱). بنابراین مطالعات فوق مؤید آن است که استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال های آزاد ممکن است در القاء آپوپتوز تحت شرایط استرس حرارتی نقش مهمی داشته باشند.

نتایج حاصل از شمارش سلول های آپوپتویک پس از ایجاد کریپتوکیدیسم تجربی یک طرفه در موش های بالغ در روزهای مختلف پس از عمل نشان داد که در روز اول پس از عمل، تغییر معنی داری در تعداد سلول های آپوپتویک در مقایسه با گروه شم ایجاد نگردید. در روز سوم پس از عمل تعداد سلول های آپوپتویک سریعاً افزایش یافته و در مقایسه با روز اول و گروه شم افزایش معنی داری نشان داد. نقطه اوج تعداد سلول های آپوپتویک در روزهای سوم و ششم بوده و روند کاهش تدریجی این سلولها پس از روز سوم و ششم شروع شد. نتایج مطالعه بارکاوی و ترومتر در سال ۲۰۰۴ روی آپوپتوز سلول های بافت بیضه پس از کریپتوکیدیسم تجربی نشان داد که اوج تعداد سلول های آپوپتویک در روز چهارم پس از عمل

روش است. بطوری که نوکلئوتیدهای نشان دار بواسطه آنزیم های درونزا به انتهای ۳' OH قطعات چسبانده می شود. در مرحله بعدی قطعات شکسته شده DNA که بواسطه نوکلئوتیدها نشان دار شده است، رهیابی می شود (۱۳). مطالعات فراوانی بر روی بافت بیضه و اپی دیدیم در افرادی که دچار عارضه کریپتوکیدیسم بوده و یا پس از ایجاد تجربی آن به روش جراحی در انسان و حیوانات مختلف، صورت گرفته است (۱۴، ۱۵، ۳-۵). بر خلاف مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر، مرگ برنامه دار سلولی یا آپوپتوز در سلول های بافت اپی دیدیم پس از ایجاد کریپتوکیدیسم تجربی مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال ایجاد استرس حرارتی فعالیت آنزیم های آندونوکلئاز موجب تخریب DNA می گردد. در طی این روند DNA به قطعاتی با طول ۱۸۰-۲۰۰ جفت باز شکسته می شود که این قسمت ها در حقیقت طولی از DNA است که به دور هیستون ها در نوکلئوزوم پیچیده می شود. به عبارت دیگر DNA در نواحی اتصالی ما بین نوکلئوزوم ها شروع به شکستن می کند، که به این حالت اصطلاحاً فراگمانانتاسیون داخل نوکلئوزومی گفته می شود (۱۶). علاوه بر مکانیسم ذکر شده فوق، مکانیسم های دیگری نیز باعث بروز تغییرات کروماتینی در هسته سلول می شود. غیرفعال شدن آنزیم هایی که در تعمیر DNA نقش دارند، یکی از این موارد است. پلی آدنوزین دی فسفات پلیمراز (PADP) اولین پروتئینی است که در آسیب های DNA وارد عمل شده و با چسبیدن به زنجیر باز شده DNA و تغییر پروتئین های هسته ای باعث تعمیر آسیب های وارد به DNA می شود. آنزیم کاسپیاز ۳ که به دنبال آپوپتوز فعل می گردد، با شکستن آنزیم PADP مملکرد آن را در تعمیر DNA از بین می برد (۱۷). تغییرات آپوپتویک به دنبال ایجاد استرس حرارتی، منحصرآ مرتبط با تغییرات هسته سلول های آپوپتویک نبوده و میتوکندری ها نیز تحت تأثیر قرار می گیرند. در میتوکندری سلول های آپوپتویک، اختلال در پتانسیل انتقال و نفوذ پذیری لایه داخلی غشاء قابل تشخیص است، بطوری که این لایه توانایی جلوگیری از نشت برخی مولکول ها را از دست می دهد (۱۶). پروتئین P53 مرتبط با پوشش هسته بوده و در زمان استرس حرارتی به داخل هسته منتقل می گردد و توقف چرخه سلولی و یا خودکشی سلولی با واسطه P53 رخ می دهد (۱۸). مطالعات انجام شده توسط محققین بیانگر وجود میزان فراوان پروتئین P53 در سلول های مختلف بافت بیضه و اپی دیدیم می باشد (۱۹). بنابراین آسیب های DNA به دنبال کریپتوکیدیسم تجربی و استرس حرارتی در این سلول ها به دور از انتظار

سلول‌های آپوپتوتیک گردد. سلول‌های آپوپتوتیک به علت ظهور سیگمال‌هایی در سطح خود سریعاً توسط سلول‌های فاگوسیت کننده تشخیص داده می‌شوند (۲۶). در سلول‌های پوششی اپی‌دیدیمی که در معرض درجه حرارت بالا و سایر استرس‌های محیطی قرار می‌گیرند، پس از چند روز پروتئین‌های شوک حرارتی ظاهر می‌شوند که پروتئین‌های سلول را در برابر اثرات مخرب استرس حرارتی محافظت می‌کنند. پروتئین‌های شوک حرارتی از دناچوره شدن پروتئین‌ها در طی استرس، نظیر درجه حرارت بالا، رادیکال‌های آزاد، واسطه‌های التهابی و عفونت‌ها جلوگیری می‌کنند (۷).

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که کریپتورکیدیسم تجربی باعث القاء آپوپتووز در سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم می‌شود و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در روز سوم و ششم بعد از عمل در حداقل میزان خود است و با گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد. علت بروز آپوپتووز احتمالاً ممکن است در ارتباط با استرس حرارتی و استرس اکسیداتیو باشد. البته نقش کریپتورکیدیسم در القاء آپوپتووز سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم انسان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

بوده و پس از آن روند کاهش تدریجی سلول‌های آپوپتوتیک دیده می‌شود. همچنین آنها با بررسی اثرات کریپتورکیدیسم تجربی روی سلول‌های زایگر بافت بیضه موش صحرایی دریافتند که بین وسعت فعالیت آپوپتوتیک سلول‌های زایگر و طول دوره کریپتورکیدیسم ارتباط وجود دارد (۲۲). کاهش تدریجی سلول‌های آپوپتوتیک پس از سومین و ششمین روز بعد از عمل می‌تواند علل مختلفی داشته باشد و نقش پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) در این امر مشخص شده است. این پروتئین‌ها که تعدادی از آنها در سلول‌های بافت بیضه و اپی‌دیدیم شناسایی شده است، می‌توانند در جلوگیری از بروز آپوپتووز در سلول‌های زایا نقش داشته باشد (۷، ۲۳، ۲۴).

این پروتئین‌ها با اتصال به پروتئین P53 از ایجاد آپوپتووز جلوگیری می‌کنند. این پروتئین‌ها در مراحل ابتدایی شوک حرارتی افزایش مشخصی نداشته و در جلوگیری از بروز آپوپتووز نقش چندانی ندارند و زمانی که در مراحل بعدی شاخص سلول‌های آپوپتوتیک بالا می‌رود، پروتئین‌های شوک حرارتی فعال می‌شوند (۲۵). این مطلب می‌تواند کاهش تدریجی سلول‌های آپوپتوتیک با افزایش مدت زمان پس از عمل کریپتورکیدیسم تجربی را توجیه نماید. همچنین پس از افزایش سریع سلول‌های آپوپتوتیک در روز سوم، فعالیت سلول‌های فاگوسیت کننده می‌تواند موجب کاهش جمعیت

REFERENCES

1. Montella A, Pirino A. Morphological findings in cryptorchism in the adult male. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990;66:215-22.
2. Gnay Y, Bulut HE, Onarlioglu B, Başimoglu-Koca Y. Comparison of the effects of vasectomy and experimental cryptorchidism in rats: I. Testicular histology. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998;75:61-69.
3. Ren L, Medan MS, Ozu M, Li C, Watanabe G, Taya K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. *J Reprod Dev* 2006;52:219-28.
4. Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Oschry I, Lotan G, Kleen B, et al. Evaluation of damage to the testicular cells of golden hamsters caused by experimental cryptorchidism using flow cytometry and confocal microscopy. *Int J Androl* 2003;26:84-90.
5. Gracia Romero J, Ferrández Longás A, Guallart Labrador A, Moros García M, Alvarez Alegret R, García Julián G. Experimental cryptorchidism in the Wistar rat. *Cir Pediatr* 1990;3:97-102.
6. Quinn FM, Crockard AD, Brown S. Secondary changes in the scrotal testis in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 1990;25:402-405.
7. Légaré C, Thabet M, Sullivan R. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. *Mol Hum Reprod* 2004;10:197-202.
8. Esponda P, Bedford JM. The influence of body temperature and castration on the protein composition of fluid in the rat cauda epididymidis. *J Reprod Fertil* 1986;78:505-14.
9. Kocak I, Dundar M, Culhaci N. Epididymal changes associated with cryptorchidism in rats. *Asian J Androl* 2001;3:277-80.
10. Bedford JM. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Adv Exp Med Biol* 1991;286:19-32.
11. Kaki T, Sofikitis N. Effects of unilateral cryptorchidism on contralateral epididymal sperm quality, quantity and fertilizing capacity. *Yonago Acta Medica* 1999;42:79-86.

12. Kawakami E, Tsutsui T, Saito S, Kakimoto T, Ogasa A. Changes in peripheral plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations and semen quality in normal and cryptorchid dogs during sexual maturation. *Lab Anim Sci* 1995;45:258-63.
13. Miura M, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T, Fujii J. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil Steril* 2002;77:787-93.
14. Pinart E, Sancho S, Briz M, Bonet S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol* 1999;239:225-43.
15. Rossi LM, Pereira LA, de Santis L, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Ortiz V, et al. Sperm retrieval techniques in rats with suppressed spermatogenesis by experimental cryptorchidism. *Hum Reprod* 2005;20:443-47.
16. Royere D, Guérif F, Laurent-Cadoret V, Hochereau de Reviers MT. Apoptosis in testicular germ cell. *Int Congr Ser* 2004;1266:170-76.
17. Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;18:159-65.
18. Yin Y, Dewolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998;58:492-96.
19. Yin Y, Stahl BC, Dewolf WC, Morgentaler A. P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 2002;23:64-70.
20. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999;61:393-99.
21. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato N, Tanaka T. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002;8:118-23.
22. Barqawi A, Trummer H, Meacham R. Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl* 2004;6:47-51.
23. Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:191-77.
24. Kumagai J, Fukuda J, Kodama H, Murata M, Kawamura K, Itoh H, et al. Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. *Eur J Biochem* 2000;267:3073-78.
25. Guo CX, Ma J, Zhou XC, Liu YX. Expression of HSP70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes. *Arch Androl* 2001;46:109-15.
26. Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, Urushitani H, Matsuzawa A, Nishina Y, et al. Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel)* 1996;157:195-204.